

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



551449

(43) 国際公開日
2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/091660 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 45/00, 31/366, 31/404, 31/4418, 31/40, 31/505, 31/47, 31/22, A61P 9/00, 9/10, C12N 15/00

LTD.) [JP/JP]; 〒1010054 東京都千代田区神田錦町 3 丁目 7 番地 1 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005316

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 14 日 (14.04.2004)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 児玉 龍彦 (KODAMA, Tatsuhiko) [JP/JP]; 〒1540002 東京都世田谷区下馬 4-1 6-5 Tokyo (JP). 森川 滋 (MORIKAWA, Shigeru) [JP/JP]; 〒1710033 東京都豊島区高田 3-4 2-1 2-5 0 4 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
60/463,311 2003 年 4 月 17 日 (17.04.2003) US

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号共同ビル Tokyo (JP).

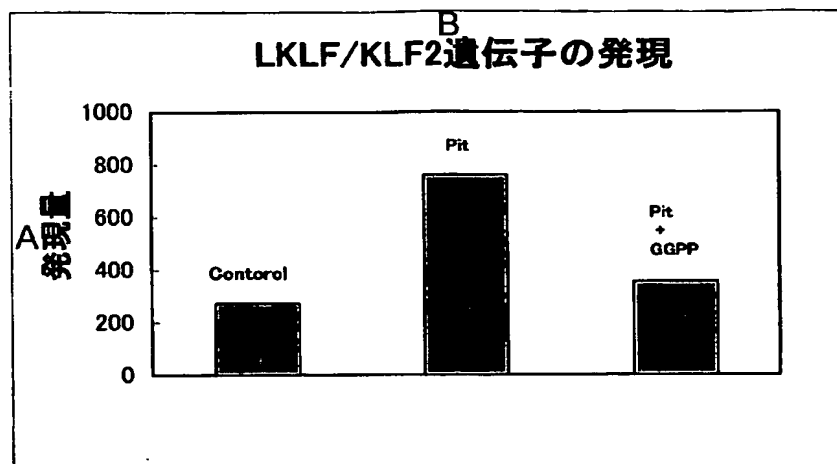
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 興和株式会社 (KOWA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒4608625 愛知県名古屋市中区錦三丁目 6 番 2 9 号 Aichi (JP). 日産化学工業株式会社 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES,

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続葉有]

(54) Title: LKLF/KLF2 GENE EXPRESSION PROMOTER

(54) 発明の名称: LKLF/KLF2遺伝子発現促進剤



A...EXPRESSION AMOUNT

B...EXPRESSION OF LKLF/KLF2 GENE

(57) Abstract: A method of promoting the expression of an LKLF/KLF2 gene characterized by comprising administering an effective amount of a substance inhibiting the mevalonate metabolic pathway.

(57) 要約: 1. 本発明は、メバロン酸代謝経路を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とするLKLF/KLF2遺伝子発現促進方法に関する。

WO 2004/091660 A1



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

LKLF/KLF2遺伝子発現促進剤

技術分野

本発明は、血管に関連する疾患、例えば糖尿病、労作狭心症、不安定狭心症、安静狭心症、心筋梗塞、粥状動脈硬化症、血管内皮機能障害、PTCA後の再狭窄、過敏性肺炎、間質性肺炎、気道狭窄、気道閉塞、眼底出血（網膜静脈閉塞症、飛蚊症等）、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、痔等の治療・症状緩和に有用な、クルップルライクファクター 2（lung Kruppel-like factor/KLF 2、以下LKLF/KLF2と略す）遺伝子発現促進剤に関する。

背景技術

LKLF/KLF2は、プロリン繰り返し配列、活性部位、核内局在シグナル、及びジンクフィンガー部分の構造を有する転写調節因子蛋白質である（Kozyrev SVらFEBS Lett. 1999 Apr 1;448 (1):149-52）。LKLF/KLF2の作用としては、血球の分化に重要であること（Kuo CTら Genes Dev. 1997 11(22):2996-3006、Anderson KPら Mol. Cell Biol. 1995 15(11):5957-65）や、血管内皮細胞と平滑筋細胞の重要な情報伝達因子であること（Monajemi Hら Thromb. Haemost. 2001 86(1):404-12）、また、T cellの増殖を抑制し、細胞の大きさや蛋白合成を抑制し、細胞表面の活性因子を減少させること（Buckley AFら Nat. Immunol. 2001 2(8):698-704）、さらには血管の安定化に必須であること（Kuo CTら Genes Dev. 1997 11(2):2996-3006）等が知られている。

一方、粥状動脈硬化症の初期病変は、血流が大きく変化する血管の湾曲部や分岐部に高発することが知られている。その発生原因として、血流の血管内皮に及ぼす剪断応力（shear stress）が関与しているといわれているが、最近の報告に

よると、LKLF/KLF2はshear stressにより血管内皮細胞から発現し（Dekker RJら Blood 2002 100 (5) :1689-98）、粥状動脈硬化症の発生に対して抑制的に関与することが指摘されている（Karin Arkenbout Eら Thromb. Haemost. 2003 89 (3) :522-9）。このように、血管内皮細胞から発現するLKLF/KLF2は、血管由来の病変に対して抑制的に作用することが推測される。

従って、LKLF/KLF2遺伝子の発現を促進することにより、動脈硬化症をはじめとする、血管に関連する疾患の症状の緩和、あるいは治療ができることが期待されるが、これまで、LKLF/KLF2遺伝子の発現を促進する物質は、生理的なものも含めて全く知られていない。

発明の開示

本発明の目的は、血管に関連する疾患、例えば糖尿病、労作狭心症、不安定狭心症、安静狭心症、心筋梗塞、粥状動脈硬化症、血管内皮機能障害、PTCA後の再狭窄、過敏性肺炎、間質性肺炎、気道狭窄、気道閉塞、眼底出血（網膜静脈閉塞症、飛蚊症等）、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、痔等の治療・症状緩和に有効なLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤を提供することにある。

そこで本発明者らは、ヒトの培養細胞系を用いてLKLF/KLF2遺伝子発現に影響を及ぼす物質を探索した結果、全く意外にもメバロン酸代謝経路を阻害する物質が、LKLF/KLF2遺伝子の発現を促進する作用を有することを見出し、本発明を完成した。

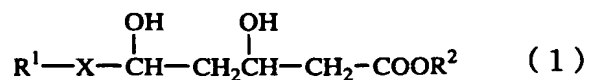
また、本発明者らは上記メバロン酸代謝経路を阻害する物質の内、HMG-C_oA還元酵素阻害剤として知られている後記一般式（1）で表される化合物、そのラクトン体又はそれらの塩、特にピタバスタチンカルシウムが、LKLF/KLF2遺伝子の発現を促進する作用を有することを見出した。

さらに、本発明者らはメバロン酸代謝経路を阻害する物質の内、FTI-276等のファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤やGGTI-286等のゲラニルゲラニルトラン

スフェラーゼ I 阻害剤、あるいは TcdB (*Clostridium difficile* Toxin B) 等のグルコシルトランスフェラーゼにも LKLF/KLF2 遺伝子発現促進作用を有することを見出した。

すなわち、本発明は、メバロン酸代謝経路を阻害する物質を有効成分とする LKLF/KLF2 遺伝子発現促進剤を提供するものである。

また、本発明は、一般式 (1)



(式中、R¹は有機基を示し、Xは—CH₂CH₂—又は—CH=CH—を示し、R²は水素原子又はアルキル基示す。)

で表される化合物、そのラクトン体又はそれらの塩を有効成分とする LKLF/KLF2 遺伝子発現促進剤を提供するものである。

また、本発明は、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤を有効成分とする LKLF/KLF2 遺伝子発現促進剤を提供するものである。

また、本発明は、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I 阻害剤を有効成分とする LKLF/KLF2 遺伝子発現促進剤を提供するものである。

また、本発明は、グルコシルトランスフェラーゼを有効成分とする LKLF/KLF2 遺伝子発現促進剤を提供するものである。

また、本発明は、LKLF/KLF2 遺伝子発現促進剤製造のためのメバロン酸代謝経路を阻害する物質の使用を提供するものである。

また、本発明は上記一般式 (1) で表される化合物、そのラクトン体又はそれらの塩の、LKLF/KLF2 遺伝子発現促進剤製造のための使用を提供するものである。

また、本発明は、LKLF/KLF2 遺伝子発現促進剤製造のためのファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤の使用を提供するものである。

また、本発明は、LKLF/KLF2 遺伝子発現促進剤製造のためのゲラニルゲラニル

トランスフェラーゼ I 阻害剤の使用を提供するものである。

また、本発明は、LKLF/KLF2遺伝子発現促進剤製造のためのグルコシルトランスフェラーゼの使用を提供するものである。

また、本発明は、メバロン酸代謝経路を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とするLKLF/KLF2遺伝子発現促進方法を提供するものである。

また、本発明は上記一般式（1）で表される化合物、そのラクトン体又はそれらの塩の有効量を投与することを特徴とするLKLF/KLF2遺伝子発現促進方法を提供するものである。

また、本発明は、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤の有効量を投与することを特徴とするLKLF/KLF2遺伝子発現促進方法を提供するものである。

また、本発明は、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I 阻害剤の有効量を投与することを特徴とするLKLF/KLF2遺伝子発現促進方法を提供するものである。

さらにまた、本発明は、グルコシルトランスフェラーゼの有効量を投与することを特徴とするLKLF/KLF2遺伝子発現促進方法を提供するものである。

本発明によれば、血管に関連する疾患、例えば糖尿病、労作狭心症、不安定狭心症、安静狭心症、心筋梗塞、粥状動脈硬化症、血管内皮機能障害、PTCA後の再狭窄、過敏性肺炎、間質性肺炎、気道狭窄、気道閉塞、眼底出血（網膜静脈閉塞症、飛蚊症等）、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、痔等の治療・症状緩和に有効なLKLF/KLF2遺伝子発現促進方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、ピタバスタチンカルシウムのLKLF/KLF2遺伝子の発現を示す図である。

図 2 は、ピタバスタチンカルシウムのLKLF/KLF2遺伝子発現に対するメバロン酸及びその各種代謝物の影響を示す図である。

図 3 は、メバロン酸代謝経路を阻害する物質のLKLF/KLF2遺伝子発現を示す図

である。

図4は、メバロン酸代謝経路を阻害する物質のLKLf/KLF2遺伝子発現に対する濃度依存性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明で使用するメバロン酸代謝経路を阻害する物質とは、アセチル-CoA → アセトアセチル-CoA → HMG-CoA → メバロン酸 → メバロニル-5-リン酸 → メバロニル-5-ピロリン酸 → イソペンテニルピロリン酸 → ゲラニルピロリン酸 → ファルネシルピロリン酸 → スクアレン → スクアレンエポキシド → ラノステロール → (デスモステロール又はラソステロール) → コレステロールの主経路の他、(イソペンテニルピロリン酸又はファルネシルピロリン酸) → ゲラニルゲラニルピロリン酸 → ゲラニルゲラニル化タンパク質群 (例えば、RhoA、Rap1a、Rac、Cdc42等のRhoタンパク質ファミリー等) の経路、及び、ファルネシルピロリン酸 → ファルネシル化タンパク質群 (例えば、Ras、RhoB等) の経路を含む、メバロン酸代謝に関わるあらゆる代謝経路を阻害する物質が含まれる。このうち、HMG-CoA還元酵素阻害剤、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼI阻害剤、グルコシルトランスフェラーゼが好ましく、中でもHMG-CoA還元酵素阻害剤、特にピタバスタチンまたはその塩が最も好ましい。

本発明で使用する一般式(1)で表される化合物、そのラクトン体又はそれらの塩は、高脂血症治療薬として有用なHMG-CoA還元酵素阻害剤として知られている化合物である。

一般式(1)で表される化合物のR¹で示される有機基は、置換基を有していてもよい環構造を有する有機基が好ましい。

環構造を有する有機基としては、インドリル基、インデニル基、ピリジル基、ピロロピリジル基、ピラゾロピリジル基、チエノピリジル基、ピリミジル基、ピ

ラゾリル基、ピロリル基、イミダゾリル基、インドリジル基、キノリル基、ナフチル基、ヘキサヒドロナフチル基、シクロヘキシル基、フェニルシリルフェニル基、フェニルチエニル基又はフェニルフリル基が挙げられ、特にヘキサヒドロナフチル基、インドリル基、ピリジル基、ピリミジル基、ピロリル基又はキノリル基が好ましい。

これらの環構造を有する有機基に置換していてもよい置換基としては、ヒドロキシ基、直鎖、分岐鎖又は環状のアルキル基、アルキルオキシアルキル基、アルキルカルボニルオキシ基、アルキル置換アミノ基、置換アルキルスルホニルアミノ基、置換フェニルスルホニルアミノ基、アルキル、フェニル等が1個又は2個置換していてもよいカルバモイル基、ハロフェニル基、アルキルフェニル基、アルコキシフェニル基、フェニル基、オキソ基等が挙げられる。

これらの環構造を有する有機基に置換してもよい置換基のうち、炭素数1～6の直鎖、分岐鎖又は環状アルキル基、炭素数2～7のアルキルオキシアルキル基、炭素数1～4のアシルオキシ基、炭素数1～4のアルキル置換アミノ基、炭素数1～4のアルキル置換炭素数1～4のアルキルスルホニルアミノ基、炭素数1～4のアルキル置換フェニルスルホニルアミノ基、炭素数1～4のアルキル置換カルバモイル基、フェニル置換カルバモイル基、フルオロフェニル基、ブロモフェニル基、ヨードフェニル基、メチルフェニル基、エチルフェニル基、メトキシフェニル基、エトキシフェニル基又はフェニル基が好ましく、特にイソプロピル基、シクロプロピル基又はp-フルオロフェニル基が好ましい。

R¹で示されるアルキル基としては、炭素数1～6の直鎖、分岐鎖又は環状アルキル基が挙げられる。

ラクトン体は、対応する一般式(1)で表される化合物を、常法、例えば酸性条件下にラクトン化することにより得られる。

一般式(1)で表される化合物及びそのラクトン体の塩は、生理学的に許容し得る塩であって、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム

塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、フェネチルアミン塩等の有機アミン塩又はアンモニウム塩等が挙げられるが、ナトリウム塩、カルシウム塩がより好ましい。

これらの化合物は、例えば米国特許第4, 739, 073号及びヨーロッパ特許出願公開第114, 027号；ヨーロッパ特許出願公開第367, 895号；米国特許第5, 001, 255号、第4, 613, 610号、第4, 851, 427号、第4, 755, 606号、第4, 808, 607号、第4, 751, 235号、第4, 939, 159号、第4, 822, 799号、第4, 804, 679号、第4, 876, 280号、第4, 829, 081号、第4, 927, 851号、第4, 588, 715号；及びF. G. Kathawala, Medical Research Reviews, 11, 121-146 (1991)、ヨーロッパ特許出願公開第304, 063号；ヨーロッパ特許出願公開第330, 057号、米国特許第5, 026, 708号、第4, 868, 185号；ヨーロッパ特許出願公開第324, 347号；ヨーロッパ特許出願公開第300, 278号；米国特許第5, 013, 749号、第5, 872, 130号、第5, 856, 336号、米国特許第4, 231, 938号、米国特許第4, 444, 784号、米国特許第4, 346, 227号、米国特許第5, 354, 772号、米国特許第5, 273, 995号、米国特許第5, 177, 080号、米国特許第3, 983, 140号、日本国特許第2, 648, 897号、米国特許第5, 260, 440号、Bioorganic & Medicinal Chemistry, 5, 437, (1977)、日本国特許第2, 569, 746号、ヨーロッパ特許第304, 063号、米国特許第5, 856, 336号等に記載されている。

本発明のLKLF/KLF2遺伝子発現促進方法の有効成分としては、ロバスタチン（米国特許第4, 231, 938号：（+）－（1S, 3R, 7S, 8S, 8aR）－1, 2, 3, 7, 8, 8a－ヘキサヒドロ－3, 7－ジメチル－8－[2－[（2R, 4R）－テトラヒドロ－4－ヒドロキシ－6－オキソ－2H－ピラン－2－イル] エチル] －1－ナフチル （S）－2－メチルブチレー

ト)、シンバスタチン(米国特許第4, 444, 784号: (+) - (1S, 3R, 7S, 8S, 8aR) - 1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-3, 7-ジメチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル 2, 2-ジメチルブタノエート)、プラバスタチン(米国特許第4, 346, 227号: (+) - (3R, 5R) - 3, 5-ジヒドロキシ-7-[(1S, 2S, 6S, 8S, 8aR) - 6-ヒドロキシ-2-メチル-8-[(S) - 2-メチルブチリルオキシ]-1, 2, 6, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-1-ナフチル]ヘブタン酸)、フルバスタチン(米国特許第5, 354, 772号: (3RS, 5SR, 6E) - 7-[3-(4-フルオロフェニル)-1-(1-メチルエチル)-1H-インドール-2-イル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸)、アトルバスタチン(米国特許第5, 273, 995号: (3R, 5R) - 7-[2-(4-フルオロフェニル)-5-イソプロピル-3-フェニル-4-フェニルカルバモイル-1H-ピロル-1-イル]-3, 5-ジヒドロキシヘブタン酸)、セリバスタチン(米国特許第5, 177, 080号: (3R, 5S) - エリスロ-(E) - 7-[4-(4-フルオロフェニル)-2, 6-ジイソプロピル-5-メトキシメチル-ピリジン-3-イル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸)、メバスタチン(米国特許第3, 983, 140号: (+) - (1S, 3R, 7S, 8S, 8aR) - 1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-7-メチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル (S) - 2-メチルブチレート)、ロスバスタチン(米国特許第5, 260, 440号、日本国特許第2, 648, 897号: 7-[4-(4-フルオロフェニル)-6-イソプロピル-2-(N-メチル-N-メタンスルホニルアミノピリミジン)-5-イル] - (3R, 5S) - ジヒドロキシ-(E) - 6-ヘプテン酸)、ピタバスタチン(米国特許第5, 856, 336号、日本国特許第2, 5

69, 746号: (3R, 5S, 6E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシー - 6 - ヘプテン酸、又はそれらの塩等が好ましく、特にピタバスタチン又はその塩が好ましい。

本発明で使用するファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤としては、FTI-276、FTI-277、FPT Inhibitor I、FPT Inhibitor II、FPT Inhibitor III、FTase Inhibitor I、FTase Inhibitor II、FTase Inhibitor III、FTase Inhibitor IV (いずれもCalbiochem社製) 等が挙げられる。

また、本発明で使用するゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I 阻害剤としては、GGTI-286、GGTI-287、GGTI-297、GGTI-298、GGTI-2133、GGTI-2147 (いずれもCalbiochem社製) 等が挙げられる。

また、本発明で使用するグルコシルトランスフェラーゼとしては、TcdB (*Clostridium difficile* Toxin B)、*Clostridium sordellii* haemorrhagic toxin、*Clostridium sordellii* lethal toxin (いずれもSigma社製) 等が挙げられる。

本発明のメバロン酸代謝経路を阻害する物質、中でも前記化合物(1)、そのラクトン体及び該化合物又はラクトン体の塩、あるいはファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I 阻害剤及びグルコシルトランスフェラーゼ等は、ヒト細胞においてLKLF/KLF2のmRNAの発現を有意に促進するので、本発明のLKLF/KLF2遺伝子発現促進方法に有用であり、LKLF/KLF2が関与する疾患の処置、特に血管に関連する疾患の処置に有用である。

またメバロン酸代謝経路を阻害する物質、中でも前記化合物(1)、そのラクトン体及び該化合物又はラクトン体の塩、あるいはファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I 阻害剤及びグルコシルトランスフェラーゼ等を用いれば、LKLF/KLF2が関与する実験系の開発、新規な医薬のスクリーニング等が可能となる。

本発明におけるメバロン酸代謝経路を阻害する物質、中でも前記化合物

(1)、そのラクトン体及び該化合物又はラクトン体の塩、あるいはファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼⅠ阻害剤及びグルコシルトランスフェラーゼ等の投与経路としては、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与又は静脈内注射剤、筋肉内注射剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、点鼻剤等による非経口投与が挙げられる。

またこのような種々の剤型の医薬製剤を調製するには、この有効成分を単独で、又は他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、矯味剤、香料、被膜剤、担体、希釈剤等を1種又はそれ以上と適宜組み合わせ用いることができる。

これらの投与経路のうち、経口投与が特に好ましい。

例えば前記化合物(1)の経口投与用製剤の調製にあたっては、有効成分の安定性を考慮してpHを調整(特開平2-6406号、日本国特許第2,774,037号、WO97/23200号等)するのが好ましい。

これらの医薬の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、通常成人の場合、有効成分を一般式(1)で表される化合物として、一日0.01~1000mg、特に0.1~100mgを、1回又は数回に分けて経口投与又は非経口投与するのが好ましい。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を 3×10^5 cells/10cm dishに蒔いた2日後に、ピタバスタチンカルシウム(図中Pitと表示)を $1.1 \mu\text{mol/L}$ になるように添加した。コントロールには、ピタバスタチンカルシウムの溶媒で

あるジメチルスルホキシド（終濃度0.0066 v/v%）を添加した。添加後8時間後に、「ISOGEN」（商標名、日本ジーン社製）を用いて全RNAを抽出した。以下の操作は、Affymetrix社の使用手順書に従った。すなわち、得られた全RNAより常法に従い、mRNAを精製し、これを元にcDNAを合成した。さらにin vitro転写によりビオチン標識cRNAを合成し、精製した後、熱処理により断片化し、遺伝子発現解析に用いるための断片化cRNAを調整した。

遺伝子発現解析方法：断片化cRNAを、「Human Genome Focus Array」（商標名、Affymetrix社製）に注入し、45℃、16時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、フィコエリスリン標識したストレプトアビジン及びビオチン化ストレプトアビジン抗体による染色を施し、「GeneChipTM用スキャナー」（商標名、Hewlett Packard製）にて遺伝子発現情報を取り込んだ。得られた情報はGENECHIP SOFTWARE（Affymetrix社製）にて解析し、発現量を比較した。

測定結果を図1に示す。

HUVECにおいて、サンプル添加8時間後のLKLF/KLF2遺伝子の発現は、コントロールでは発現量で271であるのに対し、ピタバスタチンカルシウム添加群では761と有意に促進された。また、このピタバスタチンカルシウム添加の効果は、ゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）10 μ Mの添加によって355まで減少した。従って、その作用機序としてRho因子ファミリーが関与していることが示唆された。

実施例2

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を 6×10^4 cells/6 well plate に蒔いた4日後に、ピタバスタチンカルシウム（1 μ mol/L、図中Pitと表示）及び、メバロン酸（100 μ mol/L、図中MVAと表示）、ファルネシルピロリン酸（10 μ mol/L、図中FPPと表示）、ゲラニルゲラニルピロリン酸（10 μ mol/L、図中GGPPと表示）またはコレステロール（10 μ mol/L、図中Choと表示）のメバロン酸及

びその各種代謝物を添加した。なおコントロールとして、薬物無添加群（終濃度 0.1%のDMSO）を、対照群としてピタバスタチンカルシウム（ $1\mu\text{mol/L}$ ）単独添加群も用意した。各薬物添加8時間後に「ISOGEN」（商標名、日本ジーン社製）を用いて全RNAを抽出した。得られた全RNAから逆転写酵素を用いてDNAを合成し、以下のプライマーを用いてABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)で測定した。Kruppel-like factor 2 (KLF2): the forward primer (TCTCTCCCACCGGTCTACAC:配列番号1); the reverse primer (GCAGACAGTACAAATTAAGGCCCTTA:配列番号2) and the TaqMan probe (AGAGGATCGAGGCTTGTGATGCCTTGT:配列番号3)。内部標準: the forward primer (GCTGGAAGTACCAGGCAGTGA:配列番号4); the reverse primer (TCCGGTAGTGGATCTTGGCTTT:配列番号5) and the TaqMan probe (TCTTTCCTCTTCTCCTCCAGGGTGGCT:配列番号6)。

結果を図2に示す。ピタバスタチンカルシウム単独添加群では、対薬物無添加群比693%のLKLF/KLF2遺伝子発現の増加が見られた。この増加は、メバロン酸、ファルネシルピロリン酸、ゲラニルゲラニルピロリン酸の添加により、減少したが、コレステロールには影響されなかった。従って、ピタバスタチンカルシウムによるLKLF/KLF2遺伝子発現の促進は、メバロン酸代謝経路の中でも、最終産物であるコレステロール以外の中間産物により減少することが判明した。

実施例3

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を 6×10^4 cells/6 well plate に蒔いた4日後に、ピタバスタチンカルシウム（ $1\mu\text{mol/L}$ 、図中Pitと表示）、FTI-276（ $10\mu\text{mol/L}$ 、図中FTIと表示）、GGTI-286（ $10\mu\text{mol/L}$ 、図中GGTIと表示）、*Clostridium difficile* Toxin B（50 ng/ml、図中TcdBと表示）の各薬物、及びコントロールとしてDMSO（終濃度0.1%）を添加した。添加24時間後に「ISOGEN」（商標名、日本ジーン社製）を用いて全RNAを抽出した。測定は実施例2と同様に行った。

結果を図3に示す。メバロン酸代謝経路を阻害する各薬物はLKLK/KLF2遺伝子発現に対し、いずれもコントロール比544%~2157%と強い発現促進作用を示した。

実施例4

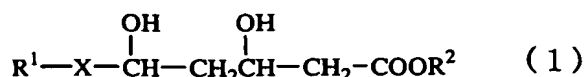
正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を 6×10^4 cells/6 well plate に蒔いた4日後に、ピタバスタチンカルシウム (0.1, 1, 10 μ mol/L、図中Pitと表示)、FTI-276 (0.1, 1, 10 μ mol/L、図中FTIと表示)、GGTI-286 (0.1, 1, 10 μ mol/L、図中GGTIと表示) の各薬物、及びコントロールとしてDMSO (終濃度0.1%) を添加した。添加8時間後及び24時間後に「ISOGEN」(商標名、日本ジーン社製) を用いて全RNAを抽出した。測定は実施例2と同様に行った。

図4に示すごとく、メバロン酸代謝経路を阻害する各薬物はLKLK/KLF2遺伝子発現に対し、いずれも濃度依存的な促進作用があることが判明した。

請求の範囲

1. メバロン酸代謝経路を阻害する物質を有効成分とするLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤。

2. メバロン酸代謝経路を阻害する物質が次の一般式 (1)



(式中、 R^1 は有機基を示し、 X は $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 又は $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示し、 R^2 は水素原子又はアルキル基を示す)

で表される化合物、そのラクトン体又はそれらの塩である請求項1記載のLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤。

3. R^1 が、置換基を有していてもよいインドリル基、インデニル基、ピリジル基、ピロロピリジル基、ピラゾロピリジル基、チエノピリジル基、ピリミジル基、ピラゾリル基、ピロリル基、イミダゾリル基、インドリル基、キノリル基、ナフチル基、ヘキサヒドロナフチル基、シクロヘキシル基、フェニルシリルフェニル基、フェニルチエニル基又はフェニルフリル基である請求項2記載のLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤。

4. 有効成分が、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン又はそれらの塩である請求項2記載のLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤。

5. 有効成分が、ピタバスタチン又はその塩である請求項2記載のLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤。

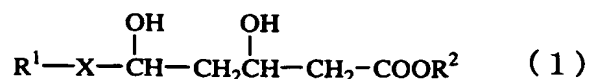
6. メバロン酸代謝経路を阻害する物質がファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤である請求項1記載のLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤。

7. メバロン酸代謝経路を阻害する物質がゲラニルゲラニルトランスフェラーゼI阻害剤である請求項1記載のLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤。

8. メバロン酸代謝経路を阻害する物質がグルコシルトランスフェラーゼである請求項1記載のLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤。

9. LKLF/KLF2遺伝子発現促進剤製造のためのメバロン酸代謝経路を阻害する物質の使用。

10. 一般式(1)



(式中、 R^1 は有機基を示し、 X は $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 又は $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示し、 R^2 は水素原子又はアルキル基を示す)

で表される化合物、そのラクトン体又はそれらの塩のLKLF/KLF2遺伝子発現促進剤製造のための使用。

11. R^1 が、置換基を有していてもよいインドリル基、インデニル基、ピリジル基、ピロロピリジル基、ピラゾロピリジル基、チエノピリジル基、ピリミジル基、ピラゾリル基、ピロリル基、イミダゾリル基、インドリル基、キノリル基、ナフチル基、ヘキサヒドロナフチル基、シクロヘキシル基、フェニルシリルフェニル基、フェニルチエニル基又はフェニルフリル基である請求項10記載の使用。

12. 有効成分が、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン又はそれらの塩である請求項10記載の使用。

13. 有効成分が、ピタバスタチン又はその塩である請求項10記載の使用。

14. LKLF/KLF2遺伝子発現促進剤製造のためのファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤の使用。

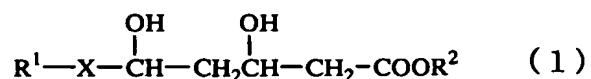
15. LKLF/KLF2遺伝子発現促進剤製造のためのゲラニルゲラニルトランスフェラーゼI阻害剤の使用。

16. LKLF/KLF2遺伝子発現促進剤製造のためのグルコシルトランスフェラー

ゼの使用。

17. メバロン酸代謝経路を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とするLKLf/KLF2遺伝子発現促進方法。

18. メバロン酸代謝経路を阻害する物質が次の一般式(1)



(式中、 R^1 は有機基を示し、 X は $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 又は $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示し、 R^2 は水素原子又はアルキル基示す)

で表される化合物、そのラクトン体又はそれらの塩である請求項17記載のLKLf/KLF2遺伝子発現促進方法。

19. R^1 が、置換基を有していてもよいインドリル基、インデニル基、ピリジル基、ピロロピリジル基、ピラゾロピリジル基、チエノピリジル基、ピリミジル基、ピラゾリル基、ピロリル基、イミダゾリル基、インドリジル基、キノリル基、ナフチル基、ヘキサヒドロナフチル基、シクロヘキシル基、フェニルシリルフェニル基、フェニルチエニル基又はフェニルフリル基である請求項18記載の方法。

20. 有効成分が、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン又はそれらの塩である請求項18記載の方法。

21. 有効成分が、ピタバスタチン又はその塩である請求項18記載の方法。

22. メバロン酸代謝経路を阻害する物質がファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤である請求項17記載のLKLf/KLF2遺伝子発現促進方法。

23. メバロン酸代謝経路を阻害する物質がゲラニルゲラニルトランスフェラーゼI阻害剤である請求項17記載のLKLf/KLF2遺伝子発現促進方法。

24. メバロン酸代謝経路を阻害する物質がグルコシルトランスフェラーゼである請求項17記載のLKLf/KLF2遺伝子発現促進方法。

図 1

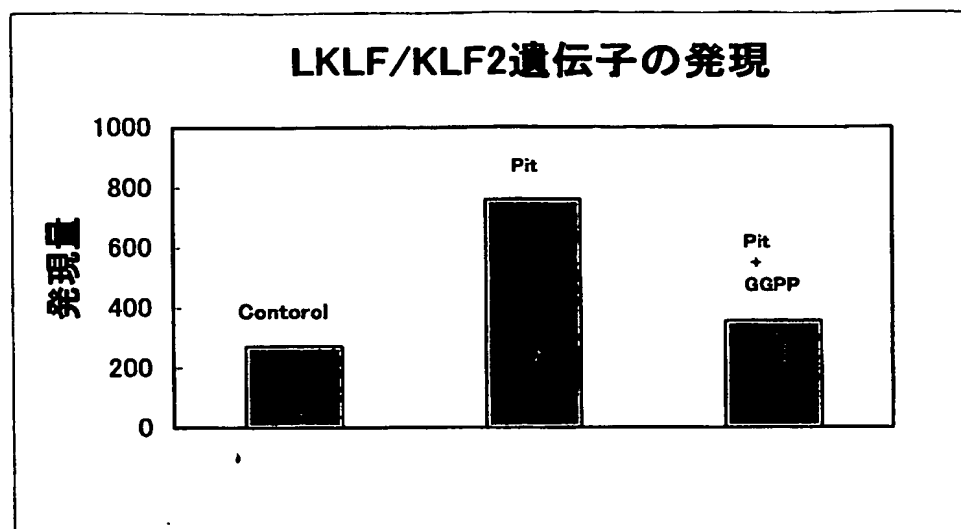


図 2

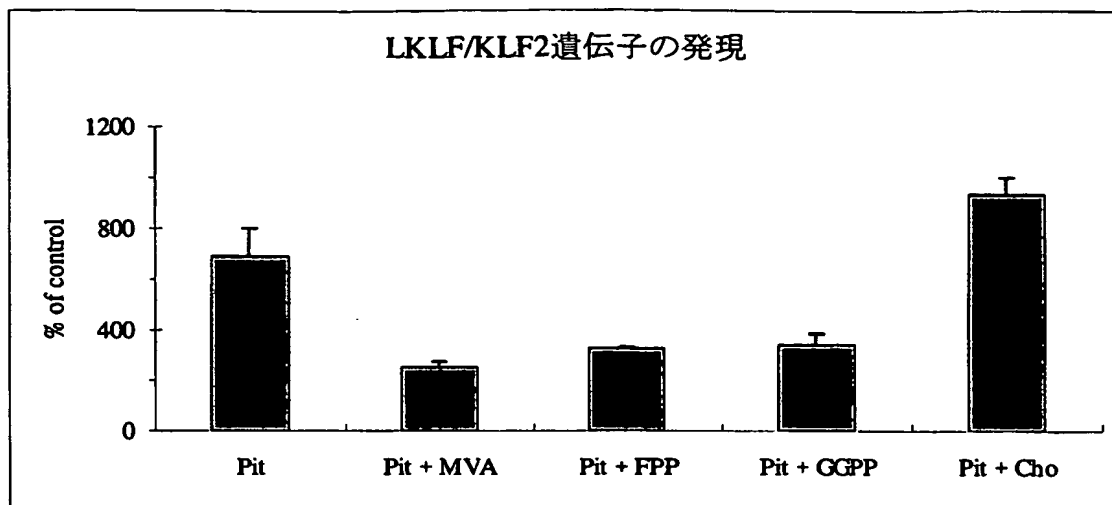


図 3

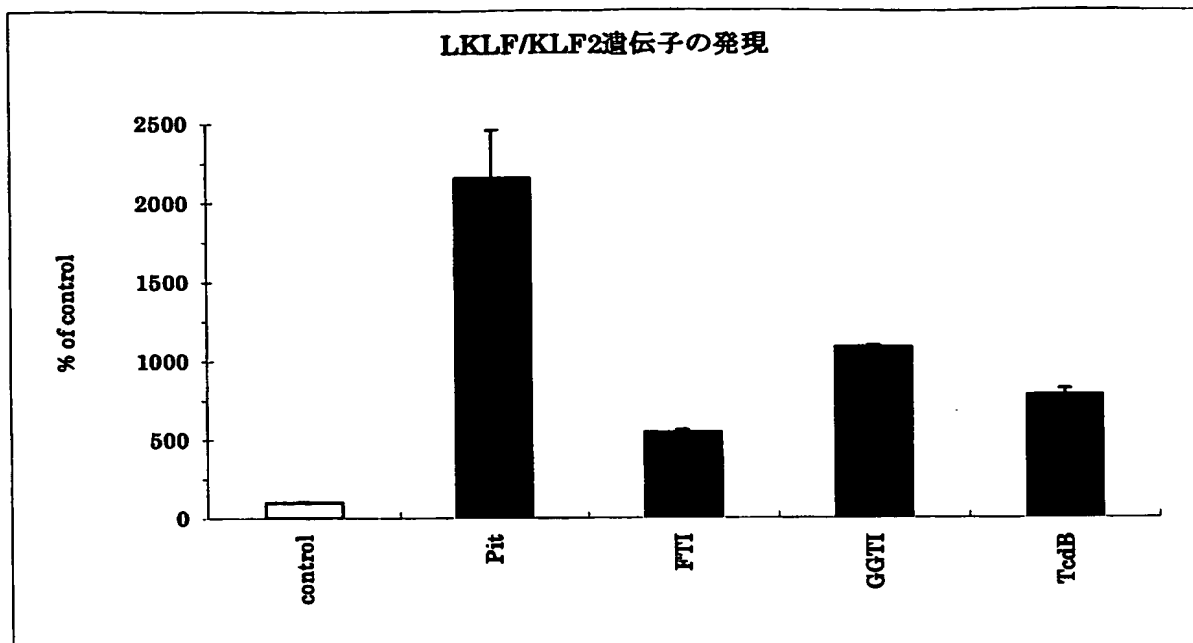
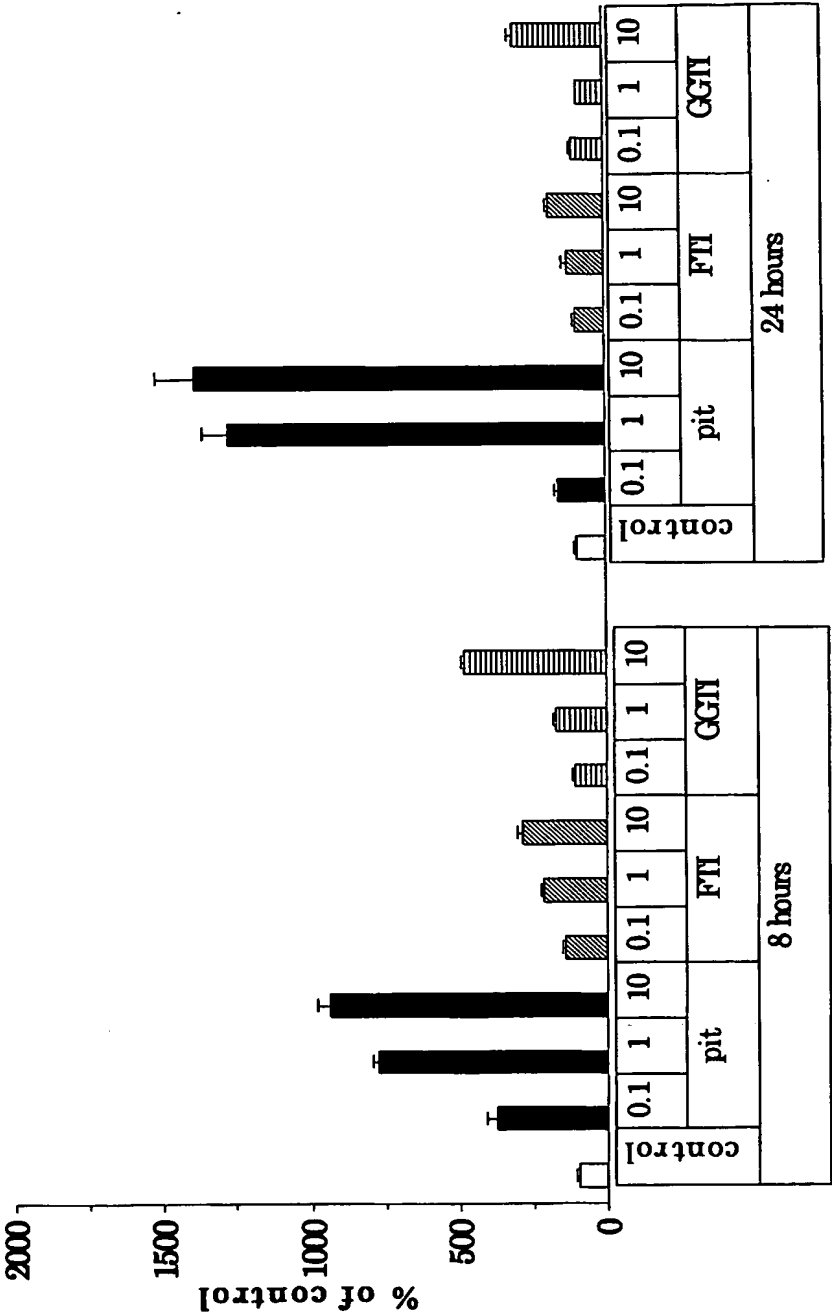


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> KOWA CO., LTD.

<120> An accelerator for the expression of LKLF/KLF2 genes

<130> KW0122

<140>

<141>

<150> US 60/463, 311

<151> 2003-04-17

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed primer KLF2
(forward)

<400> 1

tctctccac cgggtctaca c

16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed primer KLF2
(Reverse)

<400> 2

gcagacagta caaattaagg ccctta

16

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the TaqMan probe

<400> 3

agaggatcga ggcttgtgat gccttgt

17

<210> 4

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed primer KLF2
(forward)

<400> 4

gctggaagta ccaggcagtg a

11

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed primer KLF2
(Reverse)

<400> 5

tccgglagtg gatcttggct tt

12

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the TaqMan probe

<400> 6

tctttctct tctcctccag ggtggct

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005316

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/366, 31/404, 31/4418, 31/40, 31/505, 31/47, 31/22, A61P9/00, 9/10, 3/10, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/366, 31/404, 31/4418, 31/40, 31/505, 31/47, 31/22, A61P9/00, 9/10, 3/10, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOH, K.K., Effects of statins vascular wall: vasomotor function, information, and plaque stability, Cardiovasc.Res., 2000, Vol.47, No.4, p. 648-57, particularly, abstract	1-16
X	WO 2002/030425 A1 (Nissan Chemical Industries, Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), Particularly, Claim 4; page 12, lines 7 to the last line & AU 200194221 A & CZ 200300934 A3 & EP 1325745 A1 & JP 2002-533866 A & KR 2003060905 A & NO 200301678 A	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 July, 2004 (27.07.04)

Date of mailing of the international search report

10 August, 2004 (10.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005316

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRAIN, J. et al., Bcr-abl induces the expression of lung Kruppel -like factor (LKLF) and Eph receptor tryosine kinase Cek5 ligand in pre-leukemic P190Bcr-abl transgenic mice, Blood, 2000, Vol.96, No.11, Part 1, page 352a. (abstract), BIOSIS [online]; BIOSIS Accession no.2001:312489	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005316

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005316

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17-24

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 17 to 24 involve methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 31/366, 31/404, 31/4418, 31/40, 31/505, 31/47, 31/22, A61P9/00, 9/10, 3/10, C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 31/366, 31/404, 31/4418, 31/40, 31/505, 31/47, 31/22, A61P9/00, 9/10, 3/10, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KOH, K. K., Effects of statins on vascular wall: vasomotor, function, inflammation, and plaque stability, Cardiovasc. Res., 2000, Vol. 47, No. 4, p. 648-57 特にAbstract参照	1-16
X	WO 2002/030425 A1 (日産化学工業株式会社) 2002. 04. 18, 特に請求項 4、第 12 頁第 7 - 最下行参照 & AU 200194221 A & CZ 200300934 A3 & EP 1325745 A1 & JP 2002-533866 A & KR 2003060905 A & NO 200301678 A	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 07. 2004

国際調査報告の発送日

10. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安川 聡

4C

3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BRAIN, J. et al, Bcr-abl induces the expression of lung Kruppel -like factor (LKLF) and Eph receptor tyrosine kinase Cek5 ligand in pre-leukemic P190Bcr-abl transgenic mice, Blood, 2000, Volume 96, Number 11 Part 1, p. 352a. (abstract) BIOSIS [online];BIOSIS Accession no. 2001:312489	1-16

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット

☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期

☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17-24 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲17-24は、治療による人体の処置方法を包含するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。